

XP-002127206

AN - 1997-061733 [06]

AP - JP19950117046 19950516

CPY - CHUS

DC - B04

FS - CPI

IC - A61K38/22

MC - B04-J04B B14-N01

M1 - [01] M423 M781 M903 P714 V600 V624

PA - (CHUS) CHUGAI PHARM CO LTD

PN - JP8310965 A 19961126 DW199706 A61K38/22 005pp

PR - JP19950117046 19950516

XA - C1997-020025

XIC - A61K-038/22

AB - J08310965 Bone adhesion accelerator comprises parathyroid hormone (PTH) or PTH deriv.

- PTH is pref. human PTH (1-84). PTH deriv. is pref. human (1-34).

- USE - The accelerator promotes recovery of bone fracture after bone extension osteotomy, fracture or bone grafting, reduces period of treatment, or prevents re-fracture by strengthening the bone intensity. The dosage of PTH by topical admin. is 10 power -15 M to 10 power -16 M, pref. 10 power -12 to 10 power -8, and that by systemic admin. is pref. from 0.01-10000 (pref. 1-5000)microgram/head. The frequency of admin. is once a month to every day, pref. once/2 weeks, 5 times/week or every day by systemic admin. such as subcutaneous, intravenous or intranasal admin.; or topical injection.

- In an example, the necks of mature Wister rats (7-8 weeks old, 230-250g wt.) were fractured, and hPTH (1-84) was administered subcutaneously on the backs of PTH admin. gp. of the rats with a dosage of 200 microgram/kg 3 times a week. As a control gp., vehicle (1ml/kg) was administered subcutaneously. The recovery fractures were observed by soft X-ray pictures. The recovery processes were divided into 4 stages according to the conditions; soft callus, hard callus, union and remodelling. The results were that 4 out of 6 rats of vehicle gp. were hard callus and 2 out of 6 were union, whereas 4 out of 12 PTH gp. were hard callus, union and remodelling, respectively. It showed that fracture recovering conditions were promoted more efficiently in PTH gp. than that of vehicle gp.(Dwg.0/3)

IW - BONE ADHESIVE ACCELERATE PREVENT FRACTURE COMPRISE PARA THYROID HORMONE

IKW - BONE ADHESIVE ACCELERATE PREVENT FRACTURE COMPRISE PARA THYROID HORMONE

NC - 001

OPD - 1995-05-16

ORD - 1996-11-26

PAW - (CHUS) CHUGAI PHARM CO LTD

TI - Bone adhesion accelerator for preventing re-fracture, etc., - comprises para-thyroid hormone.

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-310965

(43) 公開日 平成8年(1996)11月26日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
A 6 1 K 38/22	ABJ		A 6 1 K 37/24	ABJ
	ADT			ADT

審査請求 未請求 請求項の数11 OL (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-117046

(22) 出願日 平成7年(1995)5月16日

(71) 出願人 000003311

中外製薬株式会社

東京都北区浮間5丁目5番1号

(72) 発明者 柴田 大法

愛媛県松山市北梅本町甲3280-16

(72) 発明者 奥村 秀雄

愛媛県温泉郡重信町大字志津川 愛媛大学
重信宿舎135号

(72) 発明者 山本 英広

愛媛県東宇和郡野村町大字野村9-53 町
立野村病院官舎

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨癒合促進剤

(57) 【要約】

【構成】 副甲状腺ホルモン (PTH) またはPTH誘導体を有効成分として含有する骨癒合促進剤。

【効果】 骨延長、骨切り、骨折、骨移植後などの骨修復過程を促進するため、骨癒合を促進する薬剤、再骨折を予防する薬剤または骨欠損部の修復を促進する薬剤などとして有用である。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 副甲状腺ホルモン（PTH）またはPTH誘導体を有効成分として含有する骨癒合促進剤。

【請求項2】 副甲状腺ホルモン（PTH）がヒトPTH（1-84）であることを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項3】 PTH誘導体がヒトPTH（1-34）であることを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項4】 副甲状腺ホルモン（PTH）を有効成分として含有することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項5】 副甲状腺ホルモン（PTH）がヒトPTH（1-84）であることを特徴とする請求項4記載の骨癒合促進剤。

【請求項6】 副甲状腺ホルモン（PTH）誘導体を有効成分として含有することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項7】 副甲状腺ホルモン（PTH）誘導体がヒトPTH（1-34）であることを特徴とする請求項6記載の骨癒合促進剤。

【請求項8】 骨延長における骨癒合を促進することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項9】 骨切り術後の骨癒合を促進することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項10】 骨折後の骨癒合を促進することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【請求項11】 骨移植後の骨癒合を促進することを特徴とする請求項1記載の骨癒合促進剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、骨癒合促進剤に関する。さらに詳しくは骨延長、骨切り、骨折、骨移植などの後の、特に骨折後の骨修復過程を促進することで治療期間を短縮、あるいは再骨折を予防し治療効果を発揮する薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】骨折治癒は高度に制御された一連の細胞の分化と増殖によって遂行される。骨折治癒には様々な因子が関与しており、局所因子としての腫瘍細胞増殖因子（transforming growth factor（TGF）- β ）や酸性繊維芽細胞成長因子（acidic fibroblast growth factor（aFGF））などの成長因子（growth factor）と、全身的因子としての成長ホルモン、カルシトニン、アナボリックステロイドなどのホルモンの関与が知られている。近年、骨折治癒過程における局所因子の発現は、次第に解明されてきている。骨折部の血腫形成に伴う炎症反応により未分化間葉系細胞が誘導され、そこにc-fos等のイニシエーター遺伝子（initiator gene）が発現して、TGF

2

- β などのgrowth factorが連続的に分泌され、軟骨性仮骨形成が起きる。さらに骨芽細胞の分化・発現により内軟骨性骨化がおり、徐々に骨折部の架橋が完成し、リモデリングの過程を経て骨折治癒が完成する。

【0003】現在、骨折の治療は外科的に行われているが、治療期間中患部を固定しなければならないなど患者への負担が大きい。従って、骨癒合を促進すること、あるいは再骨折を予防することでリハビリ期間を含めた治療期間を短くすることが患者にとって有益であることは疑いない。しかしながら骨癒合を有効に促進するような薬剤はまだ知られていない。

【0004】一方、骨代謝における重要なホルモンの一つとして副甲状腺ホルモン（PTH）が知られている。従来、PTHの骨に対する作用は骨吸収の促進による血液中のカルシウム濃度の上昇という面が強調され、in vivoにおいてPTHの持続投与により骨吸収が生じると報告されていた。骨折の治癒におけるPTHの影響については、ヒトPTHのN末端から34番目のアミノ酸残基までのフラグメント（hPTH（1-34））を用いた実験で、その持続的な骨吸収促進作用から骨癒合が障害されるとの報告がなされている（福原、水野日本整形外科学会雑誌、63巻、100ページ、1989年）。また、近年ヒトPTHの間欠的投与により骨量増加作用のあることが報告されてきている。しかしながらPTHが骨折などの治療の際の骨癒合を促進するという報告はまだない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、骨折等の治療過程において骨癒合を促進することでより効果のある薬剤を提供するものであり、また、この薬剤により治療期間において生じる再骨折などを防止し、予後を安定させようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、副甲状腺ホルモン（PTH）またはPTH誘導体を有効成分として含有する骨癒合促進剤に関する。

【0007】本発明における副甲状腺ホルモン（PTH）とは、天然型のPTH、遺伝子工学的手法で作成されたPTH、化学的に合成されたPTHを包含し、好ましくは84アミノ酸残基より成るヒトPTH（ヒト1-84PTH）を示す。またPTH誘導体とは、前記のPTHの部分ペプチドや、PTHそのものあるいはその部分ペプチドの構成アミノ酸を一部他のアミノ酸に置き換えたペプチドなどで同様の活性を有するペプチドを意味し、PTHの部分ペプチドとしては、たとえばヒト1-34PTH、ウシ1-34PTHなどがあげられる。1-34PTHとはPTHのN末端から34番目のアミノ酸までの34個のアミノ酸からなるPTHの部分ペプチドを示す。

【0008】本発明で骨癒合促進剤として用いられる副甲状腺ホルモン（PTH）またはPTH誘導体の好ましい例としては、ヒト1-84PTH、ヒト1-34PTH、ヒト1-38PTH、ヒト1-37PTH、ヒト1-34PTH-NH₂などがあげられ、さらに好ましくはヒト1-84PTH、ヒト1-34PTHであり、最も好ましいものとしてヒト1-84PTHがあげられる。

【0009】骨癒合促進剤とは、骨延長、骨切り、骨折、骨移植後などの骨修復過程を促進することなどで治療期間を短縮、あるいは骨強度を増すことなどにより再骨折を予防することなどで治療効果を発揮する薬剤を意味し、詳しくは骨癒合を促進する薬剤、再骨折を予防する薬剤または骨欠損部の修復を促進する薬剤を意味する。

【0010】本発明の薬剤の剤形としてはペプチドの通常の製剤方法により製造される注射剤の他に、例えばマイクロカプセルへの封入あるいはゲル状のシートに含ませるなど局所化および遅効性を期待した剤形も可能である。液剤の場合には、適当な蛋白質を添加したり、あるいは適当な付着防止剤を添加することが好ましい。

【0011】本発明の薬剤の投与方法は、全身投与でも局所投与でも行い得るが、好ましい例として、皮下投与、静脈内投与あるいは鼻腔内投与などによる全身投与や、注射により治療対象部位への局所注入などがあげられる。投与期間は、たとえば骨折の場合には、通常骨折直後からリモデリングの過程を経て骨折治癒が完了するまでの期間であり、好ましくは骨折直後から骨癒合に至る骨折治癒期間である。投与頻度は、月1回投与から連日投与が可能であり、好ましくは1回/2週から5回/週程度もしくは連日投与である。

【0012】本発明のPTHの投与量は、適応疾患、症状などにより異なるが、局所投与では組織レベルで 10^{-15} Mから 10^{-6} M程度であり、好ましくは 10^{-12} Mから 10^{-8} M程度である。全身投与では $0.01\mu\text{g}/\text{head}$ から $10000\mu\text{g}/\text{head}$ 程度であり、好ましくは $1\mu\text{g}/\text{head}$ から $5000\mu\text{g}/\text{head}$ である。

【0013】

【実施例】以下に実施例により本発明をさらに詳細に説明する。実施例で使用したPTHは、特表平4-505259号公報およびJ. Biol. Chem., 265, 15854 (1990)に記載された方法の改良法（改良点としては、たとえば、1. 融合蛋白の切断酵素をFactor Xaからトロンピンに変え、これに伴い、融合蛋白の切断部分も変換する、2. PTHの精製をイオン交換および逆相などのHPLCを組み合わせで行う、などがあげられる。）を用いて製造されたヒト1-84PTHである。

【0014】実施例1 ラット骨折モデル試験

【方法】

1. 骨折モデル動物

実験動物には雌の成熟ウィスターラット（7-8カ月齢）、体重230-250gを用いた。ペントバルビタール $40\text{mg}/\text{kg}$ の腹腔内注射による麻酔下に両側の膝蓋骨下部に約5mmの皮切を加え、脛骨結節部に直径0.8mmの穴を開け、直径0.5mm、長さ30mmのステンレスワイヤーを近位部より脛骨遠位端まで髓内釘として刺入した。次に垂直に固定された鈍な刃の上に脛骨中央部を正確において慎重に徒手的に骨折させた。手術後、ラットは自由に行動させたが、骨折部には髓内釘が挿入されているために歩容は安定しており後肢を引きずる跛行は認めなかった。ラットには標準固形食および水を自由に摂取させた。

【0015】2. 薬剤の投与および実験群

PTHを $200\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でvehicle（ビヒクル）（0.15MNaCl, 2%熱非働化ラット血清, 0.001N HCl, pH=5.0）に溶解した。薬剤の投与スケジュールは、骨折後週に3回、隔日で各群に投与した。PTH投与群は骨折後hPTH（1-84）、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ をラット背部に皮下注射した。vehicle群は骨折後vehicle $1\text{ml}/\text{kg}$ の皮下注射をした。

【0016】3. 軟X線撮影による観察

ペントバルビタール $40\text{mg}/\text{kg}$ 麻酔下に心臓採血にて屠殺後、両側の脛骨を筋組織をつけて摘出し70%エタノールにて固定した。軟部組織を丁寧に剥離し、ステンレスワイヤーを抜去後に軟X線撮影装置（Type SRO-M50、ソフロン）を用いて前後像を撮影した。軟X線写真を観察して骨折治癒段階の判定を行った。

【0017】4. 骨折部の骨塩密度の測定

軟X線撮影の後に骨折部の骨塩密度（Bone Mineral Density: BMD=骨塩量（Bone Mineral Content: BMC）（mg）/area（cm²））をdual energy x-ray absorptiometry（DXA）（DCS-600、アロカ）を用いて測定した。ここでは、脛骨全体を10等分して仮骨の含まれる部分2カ所を骨折部として、そのBMDを測定した。

【0018】【結果】統計処理はanalysis of varianceの一種のFischer's protected LSD testを用いて多重比較検定を行った。

【0019】1. 軟X線撮影による骨折治癒段階の分類

撮影した軟X線写真を観察し、骨折部の仮骨形成および骨癒合の状態を次のようにステージ分類した。石灰化の未熟な仮骨をソフトカルス（soft callus）、石灰化は成熟しているが架橋形成途上の仮骨をハードカルス（hard callus）、架橋形成によ

り骨癒合と認められるものをユニオン (union)、骨折部は癒合し骨梁等の改変が起こっているものをリモデリング (remodeling) と分類した。骨折後28日における軟X線写真によるステージ分類の結果を*

*表1に示した。

【0020】

【表1】

	vehicle群	PTH投与群
総数	6	12
ソフトカルス	0	0
ハードカルス	4	4
ユニオン	2	4
リモデリング	0	4

vehicle投与群ではユニオンよりもハードカルス状態の個体が多かった。一方、PTH投与群ではハードカルスとユニオンとリモデリングがそれぞれ3分の1ずつとなっており、vehicle投与群に比べ骨折治癒が促進されていた。

【0021】2. DXAによる骨折部の骨塩密度の測定
骨折後28日目の骨折部の骨塩密度 (BMD) は、PTH群はvehicle群より有意に高値となっていた ($p < 0.01$)。 (図1)

これらの結果は、PTHが骨折治癒過程を促進していることを示す。

【0022】実施例2 ラット骨折モデル試験

【方法】

1. 骨折モデル動物

実験動物には7週齢雄性SDラット (体重200-250g) を使用した。ペントバルビタール麻酔下に右側膝外骨下部に約5mmの皮切を加え、右下腿部の4mm近位部位の正面中央に歯科用ドリルにて0.6-0.7mm径の骨髓腔に至る小孔をあけ、0.5mm径のステンレス製のピン (長さ27mm) を近位部より脛骨遠位端まで挿入し髓内固定した後、縫合した。翌日、ペントバルビタール麻酔下に骨折作成装置を用いて腓骨接合部から約5mm上部で横骨折を作成した。ただちにX線撮影を行い、骨折部位を確認し、明白なangulation (角形成)、comminution (粉碎)、displacement (位置異常) がなく、しかも髓内釘に曲がり、欠損がみられない例を用いた。

【0023】2. 薬剤の投与および実験群

PTHは、PTH調製用バッファー (Tween 80 0.05%を含む25mMリン酸クエン酸緩衝液 (pH 5.0)) で希釈し、200μg/mlに調製し、骨折直後より週5-7回、背部皮下に100μg/kg投与

した。対照群には同量のPTH調製用バッファーを投与した。

【0024】3. 骨強度試験

左右下腿骨の力学的強度は強度試験機 (MZ500D、マルトー) を用いた捻り試験 (torsional test) により測定した。脛骨の両端は骨セメントにて間隔が2.5cmにマウントし、回転面に対して垂直にサンプルを固定し、捻り試験を実施した。サンプル破断時の最大トルク値を計測した後、得られた荷重変位曲線から、最大荷重の20%と70%の傾きを剛性として求めた。

【0025】【結果】PTH投与群では対照群に比較して投与2週目における最大トルク値の有意な上昇 (図2) と2週目および3週目における剛性の顕著な上昇 (図3) が観察された。

【0026】この結果は、PTH投与群の骨強度は対照群に比べ明らかに増しており、PTHが骨折治癒過程を促進していることを示す。

【0027】

【発明の効果】本発明の薬剤は、骨延長、骨切り、骨折、骨移植後などの骨修復過程を促進することなどで治療期間を短縮、あるいは骨強度を増すことなどにより再骨折を予防することなどで治療効果を発揮する薬剤、すなわち、骨癒合を促進する薬剤、再骨折を予防する薬剤または骨欠損部の修復を促進する薬剤などとして有用である。

【図面の簡単な説明】

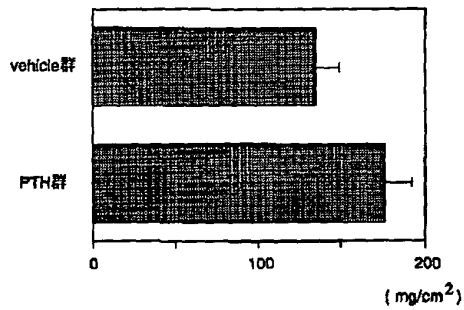
【図1】骨折後28日目の骨折部の骨塩密度 (BMD) を示す図である。

【図2】骨折後2、3週の最大トルク値を示す図である。

【図3】骨折後2、3週の剛性を示す図である。

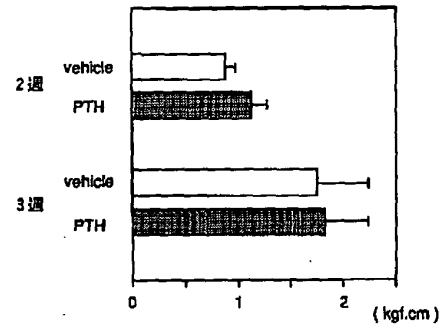
【図1】

骨折部の骨密度



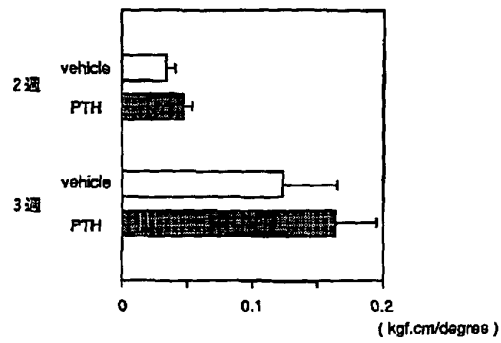
【図2】

最大トルク値



【図3】

剛性



フロントページの続き

(72)発明者 森 陸司
 東京都中央区京橋2丁目1番9号 中外製
 薬株式会社内

(72)発明者 内山 也寸志
 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外
 製薬株式会社内